CT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A61K 31/195

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/11694

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 3. April 1997 (03.04.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/04190

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. September 1996 (25.09.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 37 494.0

25. September 1995 (25.09.95) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DESITIN ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Weg beim Jäger 214, D-22335 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HANEFELD, Folker [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 40, D-37075 Göttingen (DE).

(74) Anwalt: STOLBERG, Ulrich, Graf; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: CREATINE FOR THE PROTECTION OF NEURAL TISSUE

(54) Bezeichnung: KREATIN ZUM SCHUTZ VON NEURALEM GEWEBE

(57) Abstract

The present invention pertains to the use of creatine and/or its biological precursors or metabolites in the production of a medicament for therapeutic neuroprotection before, during and/or after hypoxic ischaemic states.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Kreatin und/oder dessen biologischen Vorläufersubstanzen oder Metaboliten zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Neuroprotektion vor und/oder bei und/oder nach hypoxisch-ischämischen Zuständen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dānemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Kreatin zum Schutz von neuralem Gewebe

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Kreatin und/oder dessen biologischen Vorläufersubstanzen oder Metaboliten zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Neuroprotektion vor und/oder bei und/oder nach hypoxisch-ischämischen Zuständen.

Kreatin wird von Säugetieren sowie vom Menschen in der Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse aus den biologischen Vorläufersubstanzen Glycin, Arginin und S-Adenosylmethionin synthetisiert oder mit fleischhaltiger Nahrung aufgenommen.

Das synthetisierte oder aufgenommene Kreatin wird zu Phosphokreatin metabolisiert. Aus Phosphokreatin und Adenosin-Diphosphat (ADP) entsteht unter Einwirkung der Kreatin-Kinase Adenosin-Triphosphat (ATP) und Kreatin.

ATP ist der universelle Energieträger jeder Zelle. Zur Synthese von Molekülen, zur Kontraktion der Muskulatur und für den aktiven Transport von Molekülen sind alle Zellen auf ATP angewiesen. In Säugetieren entsteht ATP aus ADP und Phosphat in erster Linie

- 2 -

durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien. Notwendige Voraussetzung dafür ist ein sauerstoff-haltiges Milieu.

Bei hohem Energieverbrauch, wie z.B. bei einem Sprint, sinkt die Konzentration des Phosphokreatins in der Muskulatur stark ab, während die Konzentration des ADP gleichzeitig ansteigt. Die ATP-Konzentration bleibt bis zum vollständigen Verbrauch des Phosphokreatins weitgehend konstant und fällt anschließend ebenfalls rapide ab.

Die Funktion des Kreatins bzw. Phosphokreatins als Energiereserve liegt in der Vorratshaltung von energiereichem Phosphat für Phasen, in denen ein hoher Energiebedarf im Körper nicht oder nicht ausreichend schnell durch eine Steigerung der oxidativen Phosphorylierung gedeckt werden kann. Deshalb kommt Phosphokreatin besonders in den Geweben vor, die einen hohen Energieumsatz haben. Beim Menschen sind dies vorwiegend die Muskulatur und das Gehirn, wo hohe Konzentrationen an Kreatin-Kinase vorliegen. Das Kreatin/Phosphokreatin/Kreatin-Kinase-System stellt während der Synthese und des Verbrauchs von ATP ein energiereiches Phosphat-Puffersystem dar. Kreatin wird daher auch zur Leistungssteigerung bei Sportlern eingesetzt.

Aus Untersuchungen von Holtzmann et al. (Brain Research 483 (1989) 68-77) ist bekannt, daß ein Sauerstoffmangel des Gehirns, wie zum Beispiel bei pathophysiologischen Veränderungen oder Apoplexie gegeben, das rapide Verschwinden von Kreatin/Phosphokreatin, ATP und anderen energiereichen Phosphaten zur Folge hat. In der obengenannten Publikation werden zwei Reservoirs für Phosphokreatin im Gehirn postuliert, eines zur Reserve bei metabolischem Streß und das zweite zur Verwendung unter ischämischen Bedingungen.

Im Stand der Technik wurden extrem niedrige Kreatin-Konzentrationen unter anderem in Gehirntumoren (Gliom, Astrocytom und Meningiom; vql. Frahm et al., J. Comput. Assist. Tomogr. 15 (1991)

915-922) und bei drei Kindern mit einer zu schweren strukturellen und metabolischen Veränderungen der weißen Hirnsubstanz führenden Enzephalopathie (vgl. Hanefeld et al., Neuropediatrics 24 (1993) 244-248) beobachtet.

Mit Hilfe der Kernspintomographie (Kernspinspektroskopie, MRS) ist es möglich, Kreatin bzw. Phosphokreatin im Gehirn nachzuweisen. Es ist bekannt, daß bei Durchblutungsstörungen bzw. Sauerstoffmangel im Hirngewebe innerhalb von Minuten bzw. Stunden nach Wiederherstellung der Blutzirkulation und Sauerstoffversorgung das Kreatin/Phosphokreatinsignal wieder erkennbar ist (vgl. Hope et al., J. Neurochem. 49 (1987) 75-82). Das unter Hypoxie hohe MRS-Signal für anorganisches Phosphat verschwindet ebenfalls wieder. Ist der ursprüngliche Insult jedoch zu schwer, so bricht die Homöostase im Gehirn nach 16 bis 24 Stunden erneut zusammen, was als "second energy failure" bezeichnet wird. Dieser Zustand ist mit einem irreversiblen Gewebsuntergang mit allen seinen klinischen Folgen verbunden.

Es ist bekannt, daß 15 % aller Todesfälle eine Apoplexie, d.h. eine zu Sauerstoffmangel im Gehirn führende Kreislaufstörung, zugrundeliegt (vgl. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 255. Auflage, Verlag W. de Gruyter, Berlin/New York 1986, S. 105).

Bei hypoxisch geschädigten Säuglingen wird im Stand der Technik versucht, neben der Restauration der Blutzirkulation und Sauerstoffversorgung des Zentralnervensystems (ZNS) eine Organprotektion auf medikamentösem Wege zu erreichen, z.B. durch Gabe von Magnesiumpräparaten, Vitamin E oder von Antioxidantien. Diese Therapien sind über Einzelbeobachtungen, Überlegungen und erste experimentelle Ansätze hinaus nicht weiter erprobt worden. Wissenschaftlich belegte Erfolge sind bisher nicht publiziert.

Im Stand der Technik gibt es keine Hinweise dafür, wie bei hypoxisch-ischämischen Insulten des Gehirns eine effektive Organoprotektion erfolgen kann. Insbesondere gibt es bislang keine

- 4 -

Möglichkeit, bei besonders schweren Insulten das Auftreten eines "second energy failure" wirksam zu verhindern.

Bei hypoxisch-ischämischen Zuständen, beispielsweise prae-, peri- und postnataler Hypoxie bei Säuglingen und Sauerstoffmangelzuständen des Gehirns im späteren Leben, z.B. Apoplexie, sowie infolge neurotoxischer Unfälle, im Zusammenhang mit Entzündungen oder bei epileptischen Anfällen stehen bislang praktisch keine wirksamen Mittel bzw. keine therapeutischen Ansätze zur Neuroprotektion, d.h. zum Schutz des Gehirns bzw. der Nervenzellen vor irreversiblen Schäden oder Gewebsuntergang, zur Verfügung.

Wittingham und Lipton fanden, daß Anoxie die neuronale Aktivität im Säugergehirn hemmt (Wittingham et al., J. Neurochem. 37(6) (1981) 1618-1621; Lipton et al., J. Physiol. 325 (1982) 51-65). Durch in vitro Untersuchungen an Gewebsschnitten des Hippocampus des Meerschweinchens konnte gezeigt werden, daß sich unter hypoxischen Verhältnissen die Fähigkeit zur synaptischen Transmission verlängern lässt, wenn dem Gewebsbad Kreatin zugefügt wird. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wird ferner auf Untersuchungen von Woznicki et al. verwiesen (J. Neurochem. 34 (1980) 1247-1253), die sich mit der Erholung von ischämisch-hypoxischen Zuständen bei Mäusen befaßten. Den Versuchstieren wurde zunächst über einen Zeitraum von 40 bis 60 Tagen Cyclokreatin, ein Kreatin-Analogon, oral verabreicht, das sich im Gehirn akkumulierte. Die Ischämie wurde im folgenden durch Dekapitation erzeugt, wobei nachgewiesen werden konnte, daß Phosphokreatin nach etwa einer Minute verbraucht war, während Cyclokreatinphosphat noch bis zu vier Minuten nach Ischämie nachgewiesen werden konnte. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß aus den vorliegenden Untersuchungen keine Rückschlüsse darauf möglich sind, ob Nervenzellen, die Cyclokreatinphosphat enthalten, ischämisch-hypoxische Episoden besser überstehen können als unbehandelte Nervenzellen oder sich davon erholen.

- 5 -

Ein hypoxisch-ischämischer Zustand ist biochemisch im Blut durch das Absinken der Sauerstoffsättigung bei gleichzeitigem Anstieg des CO₂ Gehaltes und Azidose (Absinken des pH unter 7,25) definiert. Als Folge hiervon kommt es z. B. zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium in die Zelle, was eine Störung der Zellfunktionen und eine Instabilität der Zellorganellen bewirkt.

Bei hypoxisch-ischämischen Zuständen entstehen somit Gewebeschädigungen als Folge eines allgemeinen Sauerstoffmangels oder einer generalisierten oder lokalen Verminderung der Durchblutung. Die Gewebeschädigung wird im Gehirn als hypoxisch-ischämische Enzephalopathie bezeichnet.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, das geeignet ist, Sauerstoffmangelschäden vorzubeugen (Prophylaxe) und die Schädigung von neuralem Gewebe während bzw. nach hypoxisch-ischämischen Zuständen zu verhindern, bzw. die Regeneration von geschädigtem Gewebe zu beschleunigen und dadurch die Bildung größerer Läsionen und/oder eines "second energy failure" zu verhindern.

Es hat sich überraschend gezeigt, daß diese Aufgabe mit einem Arzneimittel gelöst werden kann, das als Wirkstoff Kreatin und/oder dessen biologische Vorläufersubstanzen oder Metaboliten enthält.

Unter den Begriff Vorläufersubstanzen fallen in diesem Zusammenhang die bei der in der Leber bzw. Bauchspeicheldrüse stattfindenden Kreatin-Biosynthese beteiligten Substrate, d.h. Glycin, Arginin, Guanidinacetat und Adenosylmethionin. Ein Metabolit des Kreatins ist beispielsweise das Phosphokreatin.

Die therapeutische Neuroprotektion hat das Ziel, den Energiestatus von neuralem Gewebe zu verbessern, um es vor den Folgen eines hypoxisch-ischämischen Zustandes zu schützen. Dadurch wird auch die Toleranz gegenüber Sauerstoffmangelzuständen vergrö-

- 6 -

ßert. Ein verbesserter Energiestatus zeigt sich daran, daß der Phosphokreatin-Spiegel einer Person im neuralen Gewebe konstant auf einem für diese Person typischen Basiswert liegt.

Der Basiswert des Kreatin-Spiegels im Hirn von gesunden, erwachsenen Personen wurde mittels Protonen-MRS bestimmt und schwankt zwischen 3,5 und 10,0 mM je nach Person und gemessener Hirnregion.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann das Arzneimittel zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert sein, und die Applikation kann zeitlich vor und/oder gleichzeitig mit und/oder nach dem initialen hypoxisch-ischämischen Zustand erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Kreatin als Kreatinmonohydrat in Pulverform verkapselt prophylaktisch verabreicht, um hypoxisch-ischämischen Zuständen vorzubeugen, bzw. die Entstehung einer entsprechenden Situation zu vermeiden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Therapie oder Prophylaxe von hypoxisch-ischämischen Zuständen beim Menschen, bei dem man den Betroffenen ein Arzneimittel, das Kreatin und/oder dessen biologischen Vorläufersubstanzen oder Metaboliten enthält, in einer wirksamen Dosis verabreicht.

Die einzunehmende Kreatinmenge bestimmt sich nach dem Körpergewicht des Patienten und nach dem Ausmaß des hypoxisch-ischämischen Insultes. In einer bevorzugten Ausführungsform wird zur Behandlung von Erwachsenen eine Dosis von 1 bis 20 g pro Tag, besonders bevorzugt 2 bis 10 g pro Tag, gegeben. Darreichungsform und Menge können vom Fachmann variiert werden, ohne dabei vom Gegenstand der Erfindung abzuweichen.

Eine nicht vollständige Liste der Ursachen des hypoxisch-ischämischen Zustandes umfaßt Apoplexie, neurochirurgische Eingriffe, neurotoxische Unfälle, Entzündungen, Sekundärfolgen eines Schä- 7 -

delhirntraumas, epileptische Anfälle, Ertrinkungs- und Erstikkungsanfälle oder Komplikationen beim Fetus bzw. Neugeborenen. Hinzu kommen metabolische Krisen und neurometabolische sowie neurodegenerative Erkrankungen. Hierher gehören auch die Prophy-Therapie chronischer entzündlicher Vorgänge einschließlich des Morbus Parkinson und der Alzheimer Erkrankung.

Die Verwendung von Kreatin als pharmakologischer Wirkstoff, d.h. der therapeutische Einsatz in vivo, wurde bislang erst in einem Fall beschrieben (Stöckler et al., Pediatric Research 36(3) (1994) 409-413). Dabei handelte es sich um ein Kind mit angeborenem Kreatinmangel im Gehirn, welches durch Supplementierung von Kreatin therapiert werden konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte überraschenderweise erstmals gezeigt werden, daß die Verwendung von Kreatin und/oder dessen biologischen Vorläufersubstanzen oder Metaboliten zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Neuroprotektion vor und/oder während und/oder nach hypoxisch-ischämischen Zuständen geeignet ist. In vorteilhafter Weise schützt es das Gehirn vor Gewebsuntergang, da Energiemangel während eines hypoxisch-ischämischen Zustandes verhindert, bzw. second energy failure-Zustände wirksam unterdrückt werden können. Bei dem erfindungsgemäß unter Verwendung von Kreatin hergestellten Arzneimittel handelt es sich somit auch um ein Arzneimittel zur prophylaktischen Behandlung von Hirngewebsschäden infolge hypoxisch-ischämischer Insulte.

Die folgenden experimentellen Ergebnisse belegen die neuroprotektive Wirkung einer Kreatin-Supplementierung:

Beispiel 1: Kreatin-Supplementierung

1.1 ATP- und Phosphokreatin-Konzentration nach Kreatin-Supplementierung:

In dieser Versuchsreihe wurden Mäuse während der letzten 10 Tage der Gestation mit Kreatin supplementiert und anschließend wurde der ATP- und der Phosphokreatin-Gehalt in Hirnstamm-Schnitten von Nachkommen dieser Mäuse untersucht. Die Bestimmung des Phosphokreatin- und ATP-Gehaltes erfolgte mittels einer enzymatischen Analyse (Lamprecht et al., Kreatinphophat, Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsgb. Bergmeyer, H. U., Verlag Chemie, Weinheim, 1974, Bd. 2, S. 1825-1829).

Zusätzlich wurde die rhythmische Aktivität eines intakten Regelkreises aus isolierten hypoglossalen Nerven-Wurzeln und von Neuronen aus dem Bereich des pre-Bötzinger-Komplexes unter Verwendung des "Ganz-Zellen-Patch-Verfahrens" gemessen (vgl. Ramirez et al., Postnatal Changes in the Mammalian Respiratory Network as revealed by the Transverse Brainstem Slice of Mice, J. Physiol., Vol. 491 (3), S. 788-811, [1996] und Smith et al., Pre-Bötzinger Complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals, Science, Vol. 254, S. 726-729 [1991]).

Im einzelnen wurden Gewebeschnitte von Tieren untersucht, die zuvor nach einem der folgenden Protokolle behandelt worden waren:

- (a) Gewebeschnitte von Nachkommen von Mäusen, die für 10 Tage mit 2 g/kg/Tag Kreatin supplementiert worden waren (n=8), sowie von Nachkommen nicht-supplementierter Tiere (n=16);
- (b) Gewebeschnitte von Nachkommen nicht-supplementierter Tiere, wobei die Gewebeschnitte für 3 Stunden in einer 200 μM Kreatin-Lösung inkubiert wurden (n=22), sowie von Kontrollen (n=22), die nicht in Kreatin inkubiert wurden; und

(c) Gewebeschnitte von Nachkommen nicht-supplementierter Tiere, wobei die Gewebeschnitte nach einer 3 stündigen Inkubation in einer 200 μM Kreatin-Lösung einer 30 minütigen Anoxie ausgesetzt wurden (n=22), sowie von Kontrollen (n=22), die keiner Anoxie ausgesetzt wurden. Anoxie wurde induziert, indem die Hirnstamm-Gewebeschnitte in CSF ("cerebrospinal fluid" entspricht Liquor cerebrospinalis) gelagert wurden, welcher mit 95 % N₂ und 5 % CO₂ (pH 7,4) begast wurde.

Die Ergebnisse des obigen Versuchs sind in Abbildung 1 aufgeführt (wobei die mit (a), (b) und (c) bezeichneten Blöcke jeweils dem oben beschriebenen Behandlungsprotokoll entsprechen) und in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt:

ATP und Phosphokreatin in µMol/g Feuchtgewicht

ATP

Behandlung der Tiere/Schnitte	Kreatin	Kontrolle
Fütterung von Kreatin	9,74 +/- 1,36	9,39 +/- 2,04
3 Std. Inkubation mit Kreatin	7,50 +/- 0,76	7,11 +/- 1,46
3 Std. Inkubation + 30 min Anoxie	9,01 +/- 0,12	5,06 +/- 0,22

Phosphokreatin

Behandlung der Tiere/Schnitte	Kreatin	Kontrolle
Fütterung von Kreatin	1,94 +/- 0,09	1,07 +/- 0,33
3 Std. Inkubation	3,15 +/- 0,43	2,78 +/- 0,30
3 Std. Inkubation + 30 min Anoxie	1,68 +/- 0,08	0,13 +/- 0,06

1.2 Neuronale Reaktion auf Anoxie nach Kreatin-Supplementierung:

Die Reaktion der Atmung auf Hypoxie wurde an Hirnstamm-Schnitten von Nachkommen (n = 30) von Mäusen untersucht, die mit Kreatin supplementiert worden waren (2 g/kg/Tag) (supplementierte Gruppe), sowie an Schnitten von nicht-supplementierten Tieren, die für 3 Stunden in einer Kreatin enthaltenden Lösung (200 µM) inkubiert wurden. Dabei wurde die rhythmische Aktivität eines intakten Regelkreises aus isolierten hypoglossalen Wurzeln und von Neuronen aus dem Bereich des pre-Bötzinger-Komplexes zu verschiedenen postnatalen Stadien (zwischen Tag 0 und 13) unter Verwendung des "Ganz-Zellen-Patch-Verfahrens" bestimmt (vql. Hille und Bertil, Ionic Channels of excitable membranes, Sinauer Association [1992]). Für eine Dauer von 30 Minuten wurde Anoxie induziert, indem die Hirnstamm-Gewebeschnitte in CSF gelagert wurden, welches mit 95 % N2 und 5 % CO2 (pH 7,4) begast wurde. Die zelluläre Antwort während der hypoxischen Augmentation, hypoxischen Depression (nach 20 Minuten) und 10 Minuten nach dem Ende der Anoxie (Erholung) wurde als Amplitude der neuronalen Entladung (in mV) gemessen, bzw. die prozentuale Abweichung vom Normalwert wurde bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

In Kreatin-behandelten neonatalen Tieren zeigte die motorische Aktivität von Nervus XII erhöhte Synchronisation während der Entladung der respiratorischen Nerven. In neonatalen Tieren (Tage 0-5) wechselte die Amplitude und die Dauer der Entladung respiratorischer Neuronen während der Augmentation von +14 % (Kontrollen) auf +40,5 % (supplementierte Gruppe) und von +3 % auf +37,2 % respektive. In den reifen Kontrolltieren (Tage 6-13) stieg die Amplitude der Entladung und die Zeitdauer um durchschnitlich +11,8 % und +14,4 %. In Schnitten supplementierter Tiere betrug die Steigerung

- 11 -

+47,3 % und +21,2 %. Alle mit Kreatin behandelten Schnitte von reifen Tieren erholten sich schneller von der Anoxie als nicht-behandelte Schnitte.

1.3 Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Eine orale Aufnahme von Kreatin kann den Gehalt des als Energiereserve in Nervenzellen vorliegenden Phosphokreatins deutlich erhöhen. Das Kreatin kann die Plazenta passieren; eine Supplementierung der Mutter führt somit zu einem erhöhten Phosphokreatin-Gehalt im neuronalen Gewebe des Embryo.
- Die Supplementierung mit Kreatin führt nur zu einer geringfügigen Steigerung des ATP-Gehalts in neuralem Gewebe.
- Während eines hypoxischen Zustandes ist der Gehalt an ATP und Phosphokreatin in Schnitt-Präparationen, die mit Kreatin behandelt wurden, deutlich und länger erhöht als in unbehandelten Vergleichsschnitten.
- Der erhöhte Phosphokreatin- und ATP-Gehalt führt zu einer gesteigerten und verlängerten Augmentationsreaktion. Die Schnitt-Präparate von mit Kreatin behandelten Tieren erholten sich schneller als die Präparate der unbehandelten Tiere.

Die Ergebnisse zeigen somit eindeutig, daß Kreatin bei Hypoxie eine neuroprotektive Wirkung aufweist und die Verwendung von Kreatin zur Prophylaxe gegen und Therapie von hypoxisch-ischämischen Zuständen geeignet ist.

- 12 -

Beispiel 2: Herstellung von Kreatin enthaltenden Arzneimitteln

A Pulver:

Kreatin-Monohydrat wird mit 0,5% Magnesiumstearat und 0,5% Aerosil 200 vermischt und in Dosen, Gläser oder Sachets gefüllt.

B Trinkgranulat:

Eine Mischung aus Kreatin-Monohydrat mit 3% Polyvinylpyrrolidon wird in einem Hochleistungsmischer unter Ethanolzugabe granuliert.

Nach Trocknung und Siebung wird das Granulat mit 0,5% Aerosil 200 und 0,5% Magnesiumstearat vermischt und in Dosen, Gläser oder Sachets gefüllt

C Brausetabletten

1 Teil Kreatin-Monohydrat wird mit 0,5 Teilen Natriumhydrogencarbonat und 0,5 Teilen Citronensäureanhydrat vermischt und anschließend mit Hilfe eines Kompaktors trocken granuliert.

Es werden 1 Teil Sorbit und 0,15 Teile Polyethylenglykol 6000 dazu gegeben worauf erneut gemischt wird. Die pressfertige Mischung wird bei 25 °C und 30% relativer Feuchtigkeit zu Brausetabletten verarbeitet.

D Parenterale Form

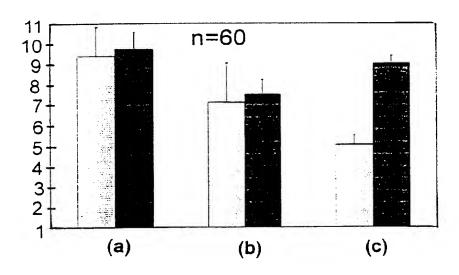
1,3 Teile Kreatin-Monohydrat und 0,8 Teile Natriumchlorid werden unter aseptischen Bedingungen in 100 Teilen Wasser für Injektionszwecke gelöst. Die Lösung wird steril filtriert und unter Reinraumbedingungen in Infusionsflaschen gefüllt.

<u>Patentansprüche</u>

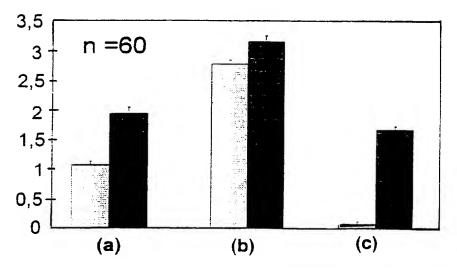
- 1. Verwendung von Kreatin und/oder dessen biologischen Vorläufersubstanzen oder Metaboliten zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Neuroprotektion vor und/oder bei
 und/oder nach hypoxisch-ischämischen Zuständen.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert ist.
- 3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der hypoxisch-ischämische Zustand als Folge einer Apoplexie, eines neurochirurgischen Eingriffs, eines neurotoxischen Unfalls, einer Entzündung, von Sekundärfolgen eines Schädelhirntraumas, von Ertrinkungs- und Erstickungs- anfällen, Komplikationen beim Feten, bzw. beim Neugeborenen, eines epileptischen Anfalls oder einer neurodegenerativen, chonisch entzündlichen Erkrankung wie Morbus Parkinson oder Alzheimer eintritt oder eintreten könnte.

Abbildung 1

ATP-Konzentration



Phosphokreatin-Konzentration



Kontroll-Gruppe

Kreatin supplementierte Gruppe
1/3

Abbildung 2

Neuronale Reaktion auf Hypoxie nach Kreatin-Supplementierung

Durchschnittliche Entladung respiratorischer Neuronen

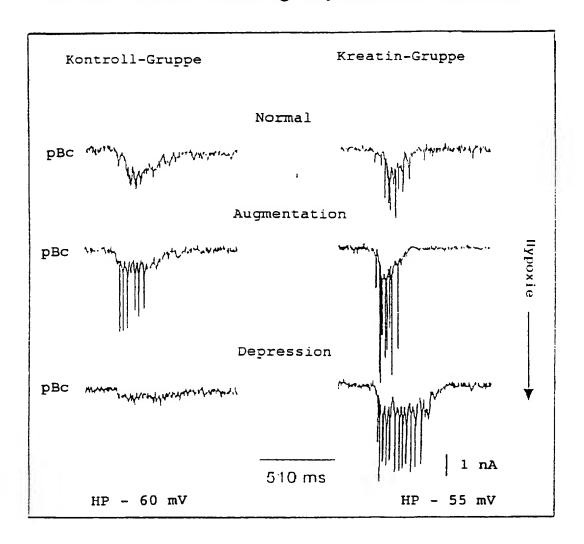
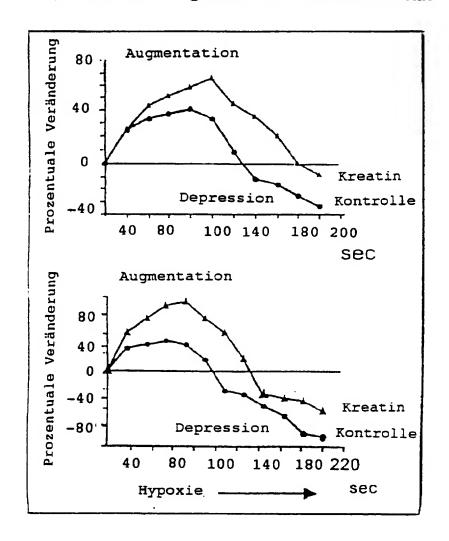


Abbildung 3

Neuronale Reaktion auf Hypoxie nach Kreatin-Supplementierung

Amplitude der integrierten Nervus XII Aktivität



Int tional Application No PUT/EP 96/04190

A. CLASS IPC 6	SIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/195		
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national cl	assification and IPC	
	S SEARCHED		
IPC 6	documentation searched (classification system followed by classif $A61K$		
	ation searched other than minimum documentation to the extent t		
Electronic o	data base consulted during the international search (name of data	base and, where practical, search terms useu)	
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	ne relevant passages	Relevant to claim No.
х	J.NEUROCHEM., vol. 64, no. 6, June 1995, pages 2691-2699, XP000616576 A.J.CARTER ET AL.: "Preincubat Creatine Enhances Levels of Cre Phosphate and Prevents Anoxic D Rat Hippocampal Slices" see the whole document	eatine	1-3
X,P	WO 96 14063 A (AVICENA GROUP IN 1996 see page 4, line 22 - page 5, l see page 9, line 9 - page 16, l	ine 4	1-3
X	DE 41 33 366 A (NYCOMED ARZNEIM 15 April 1993 see the whole document	fITTEL GMBH)	1-3
X Furd	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.
'A' docume consider if earlier of filing of 'L' docume which catator 'O' docume other in 'P' docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified) sent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	"T" later document published after the integration or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or the invention. "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the do. "Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or in ments, such combination being obvious in the art. "&" document member of the same patent.	claimed invention but the considered to cournent is taken alone claimed invention the considered to cournent is taken alone claimed invention inventive step when the core other such docurus to a person skilled
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international se	arch report
6	February 1997	21.02.97	
Name and n	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Theuns, H	

1

Inte vonal Application No PCI/EP 96/04190

		PC1/EP 90/04190
C.(Continua	don) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 981 691 A (OSTERHOLM ET AL.) 1 January 1991 see column 6; example 1	1-3
X	EP 0 344 997 A (SANWA KAGAKU KENKYUSHO LTD.) 6 December 1989 see page 2	1-3
X	EP 0 199 117 A (SCHIAPPARELLI FARMACEUTICI S.P.A.) 29 October 1986 see the whole document	1-3
x	EP 0 222 257 A (SCHIAPPARELLI FARMACEUTICI S.P.A.) 20 May 1987 see column 1, paragraph 1	1-3
A	WO 91 07954 A (DIOGUARDI) 13 June 1991 see the whole document	1-3
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-183072 XP002024693 & CA 2 078 712 A (NYCOMED ARZNEIMITTEL GMBH) , 24 March 1993 see abstract	1-3

1

International application No.

PCT/EP 96/04190

Box 1	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	ernational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	Claims Nos.: 1-3
	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
	The definition of compounds as "biological precursor
	substances or metabolites" makes a complete search
3.	Claims Nos.: basically impossible.
	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report
	covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is
	restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
Remark	on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	No protest accompanied the payment of additional search fees.

information on patent family members

Interional Application No PCI/EP 96/04190

Patent document cited in search report	Publication date				
WO-A-9614063	17-05-96	AU-A-	4151996	31-05-96	
DE-A-4133366	15-04-93	NONE			
US-A-4981691	01-01-91	US-A-	4378797	05-04-83	
		US-A-	4830849	16-05-89	
		US-A-	4840617	20-06-89	
		US-A-	4445500	01-05-84	
		US-A-	5085630	04-02-92	
		AU-B-	566457	22-10-87	
		AU-A-	6932981	15-10-81	
		CA-A-	1202867	08-04-86	
		EP-A-	0037992	21-10-81	
		JP-C-	1721663	24-12-92	
		JP-B-	4008408	17-02-92	
		JP-A-	57018608	30-01-82	
		JP-C-	1635617	20-01-92	
		JP-B-	2060347	17-12-90	
		JP-A-	2198562	07-08-90	
		US-A-	4393863	19-07-83	
		US-A-	4445514	01-05-84	
		US-A-	4445886	01-05-84	
		US-A-	4758431	19-07-88	
		US-A-	4686085	11-08-87	
		US-A-	4795423	03-01-89	
EP-A-0344997	06-12-89	JP-A-	1305033	08-12-89	
		JP-A-	1305032	08-12-89	
		US-A-	5041429	20-08-91	
EP-A-0199117	29-10-86	US-A-	4675314	23-06-87	
EP-A-0222257	20-05-87	AU-A-	6486786	14-05-87	
		JP-A-	62149621	03-07-87	
WO-A-9107954	13-06-91	IT-B-	1237519	08-06-93	
		AU-A-	6732190	26-06-91	
		EP-A-	0455770	13-11-91	

Intr ronales Aktenzeichen
PC I / EP 96/04190

A. KLASS IPK 6	ifizierung des anmeldungsgegenstandes A61K31/195		
Nach der Ir	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen K	Classifikation und der IPK	
	ERCHIERTE GEBIETE		
	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssyml	bole)	
IPK 6	A61K		
Recherchier	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s	soweit diese unter die recherchierten Gebiet	e fallen
-			Such a (fa)
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (1	Name der Datenoank und evu. Verweindete	Suche grine)
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategone*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Anga	be der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
х	J.NEUROCHEM., Bd. 64, Nr. 6, Juni 1995,		1-3
	Seiten 2691-2699, XP000616576 A.J.CARTER ET AL.: "Preincubation	on with	
	Creatine Enhances Levels of Creat		
	Phosphate and Prevents Anoxic Dar		
	Rat Hippocampal Slices" siehe das ganze Dokument		
X,P	WO 96 14063 A (AVICENA GROUP INC. 1996	.) 17.Mai	1-3
	siehe Seite 4, Zeile 22 - Seite 5	5, Zeile 4	
	siehe Seite 9, Zeile 9 – Seite 16 13	5, Zeile	
х	DE 41 33 366 A (NYCOMED ARZNEIMIT	TTEL GMBH)	1-3
	siehe das ganze Dokument	(4)	
		-/	
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröffe	Kategonen von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, icht als besonders bedeutsam anzuschen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach den oder dem Prioritätsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern n	it worden ist und mit der ur zum Verständnis des der
'E' älteres	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedanum veröffentlicht worden ist	Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedet	
"L" Veröffe	mtlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	kann allein aufgrund dieser Veröffentli erfindenscher Tätigkeit beruhend betra	chung nicht als neu oder auf
andere	in im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden ler die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie		itung, die beanspruchte Erfindung
ausgefi "O" Veröffe	ührt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	werden, wenn die Veröffentlichung mi Veröffentlichungen dieser Kategone in	t einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und
eine Be "P" Veröffe	enutzung eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht mitlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	diese Verbindung für einen Fachmann *& Veröffentlichung, die Mitglied derselbe	naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re-	herchenberichts
6	.Februar 1997	2 1. 02. 97	
Name und F	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europaisches Patentamt, P.B. 3818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Thouse !!	
	Fax (+31-70) 340-3016	Theuns, H	

1

Intr Ponales Aktenzeichen
PCI/EP 96/04190

PCT/EP 96/04190					
Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN tegone* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.					
tegone*	Bezeichnung der Veroffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenuen	Tette Bed. Alapideli Nt.			
	US 4 981 691 A (OSTERHOLM ET AL.) 1.Januar 1991 siehe Spalte 6; Beispiel 1	1-3			
	EP 0 344 997 A (SANWA KAGAKU KENKYUSHO LTD.) 6.Dezember 1989 siehe Seite 2	1-3			
	EP 0 199 117 A (SCHIAPPARELLI FARMACEUTICI S.P.A.) 29.0ktober 1986 siehe das ganze Dokument	1-3			
	EP 0 222 257 A (SCHIAPPARELLI FARMACEUTICI S.P.A.) 20.Mai 1987 siehe Spalte 1, Absatz 1	1-3			
	WO 91 07954 A (DIOGUARDI) 13.Juni 1991 siehe das ganze Dokument	1-3			
	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-183072 XP002024693 & CA 2 078 712 A (NYCOMED ARZNEIMITTEL GMBH), 24.März 1993 siehe Zusammenfassung	1-3			

1

Ir mationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04190

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt I)
Gemäß Artikel 17(2)2) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. X Ansprüche Nr. 1-3 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich Die Definition von Verbindungen als "biologische Vorläufersubstanzen oder Metaboliten" macht eine vollständige Recherche im wesentlichen unmöglich.
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlich. "en, die zur selben Patentfamilie gehören

Interionales Aktenzeichen
PCI/EP 96/04190

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	
WO-A-9614063	17-05-96	AU-A-	4151996	31-05-96
DE-A-4133366	15-04-93	KEINE		
US-A-4981691	01-01-91	US-A- US-A- US-A- US-A- US-A- AU-A- CA-A- EP-A- JP-C- JP-B- JP-C- JP-B- US-A- US-A- US-A- US-A-	4378797 4830849 4840617 4445500 5085630 566457 6932981 1202867 0037992 1721663 4008408 57018608 1635617 2060347 2198562 4393863 4445514 4445886 4758431 4686085	05-04-83 16-05-89 20-06-89 01-05-84 04-02-92 22-10-87 15-10-81 08-04-86 21-10-81 24-12-92 17-02-92 30-01-82 20-01-92 17-12-90 07-08-90 19-07-83 01-05-84 19-07-88 11-08-87
EP-A-0344997	06-12-89	US-A- JP-A- JP-A- US-A-	4795423 1305033 1305032 5041429	03-01-89 08-12-89 08-12-89 20-08-91
EP-A-0199117	29-10-86	US-A-	4675314	23-06-87
EP-A-0222257	20-05-87	AU-A- JP-A-	6486786 62149621	14-05-87 03-07-87
WO-A-9107954	13-06-91	IT-B- AU-A- EP-A-	1237519 6732190 0455770	08-06-93 26-06-91 13-11-91